

УДК 543.253

ИММУНОЭКСТРАКЦИОННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ГЕРБИЦИДА СИМАЗИНА В ВОДЕ И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ С АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

*Н.Ю.Ильичева, Э.П.Медянцева, Г.К.Будников
Казанский государственный университет
420008, Казань, Кремлевская, 18
e-mail:Elvina.Medyantseva@ksu.ru*

Поступила в редакцию 22июля 2002 г.

Предложен вариант иммунохимического определения гербицида симазина с использованием антител, иммобилизованных на различных носителях, и амперометрического холинэстеразного биосенсора. Исследованы и оптимизированы рабочие условия проведения стадий иммуноэкстракции и детектирования. Разработаны методики определения симазина в воде и молочных продуктах с нижней границей определяемых содержаний $1 \cdot 10^{-11}$ М.

Ильичева Наталья Юрьевна – аспирант кафедры аналитической химии Казанского государственного университета.

Область научных интересов: амперометрические биосенсоры, иммунохимический анализ, анализ объектов окружающей среды и пищевых продуктов.

Автор 1 опубликованной работы.

Медянцева Эльвина Павловна - доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии Казанского государственного университета.

Область научных интересов: электроаналитическая химия, ферментативный ката-

лиз, биосенсоры, электрокаталитические процессы, иммунохимический анализ.

Автор более 150 опубликованных работ.

Будников Герман Константинович – доктор химических наук, профессор, академик МАНВШ, член-корреспондент РАЕН, заведующий кафедрой аналитической химии Казанского государственного университета.

Область научных интересов: электрохимические методы анализа, биосенсоры, модифицированные электроды, экоаналитический контроль.

Автор более 700 опубликованных работ.

Следствием применения различных химических средств защиты растений является присутствие их остаточных количеств в объектах окружающей среды и продуктах питания. Гербицид сим-1,3,5-триазинового ряда симазин обладает повышенной персистентностью, поэтому его следовые количества могут продолжительное время сохраняться в почве на территории его применения [1]. Этот пестицид относится к числу строго нормируемых токсикантов и его присутствие в воде гигиенического применения не допускается [2].

Из существующих методов обнаружения пестицидов чаще всего применяют различные варианты хроматографии [3-4]. Однако для хромато-

графических определений требуется достаточно дорогостоящее оборудование, а также специально обученный персонал. Кроме того, хроматографические процедуры чаще всего отличаются продолжительностью и трудоемкостью и, в ряде случаев, требуют предварительного концентрирования определяемых компонентов.

Одним из перспективных направлений поиска новых способов контроля следовых количеств пестицидов является использование иммунохимических реакций для селективного и чувствительного определения. Несмотря на существующие методы иммунохимического анализа пестицидов, большинство из которых основаны на принципах твердофазного иммуоферментного

анализа, ощущается необходимость в разработке новых, более простых по выполнению и экспрессных вариантов метода. Все сказанное относится и к определению гербицидов группы сим-1,3,5-триазинов, для которых описаны некоторые иммунохимические методики [5-8]. В то же время существующие способы определения триазинов не всегда удовлетворяют конкретным требованиям проведения анализа.

Биосенсоры на основе иммобилизованной холинэстеразы хорошо зарекомендовали себя при определении широкого круга пестицидов [9-11], к числу которых относятся и гербициды группы сим-1,3,5-триазина. Амперометрические биосенсоры характеризуются широкой областью рабочих концентраций, низкими значениями нижних границ определяемых содержаний [12], однако их действие, в целом ряде случаев, не отличается достаточной селективностью. Отклик таких биосенсоров (особенно при анализе сложных по составу образцов) несет информацию о суммарном содержании эффекторов холинэстеразы в исследуемом объекте. Представляло интерес разработать такой способ анализа исследуемых соединений, который бы объединял и сочетал преимущества обоих этих подходов, то есть специфичность иммунохимических реакций и высокую чувствительность амперометрических биосенсоров.

Цель настоящей работы состояла в разработке варианта иммунохимического определения симазина, основанного на использовании иммобилизованных антител для экстракции с последующим амперометрическим детектированием с помощью холинэстеразного биосенсора.

Экспериментальная часть

Работа выполнена на осциллографическом полярографе ПО-5122, модель 03 с ячейкой, термостатированной при $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$ с помощью термостата ТС-50. Рабочим электродом служил холинэстеразный биосенсор, состоящий из трансдьюсера – ртутно-пленочного электрода с серебряной подложкой и биочувствительной части – иммобилизованной холинэстеразы (ИХЭ). В качестве электрода сравнения использовали насыщенный каломельный электрод. Растворенный кислород удаляли из рабочего раствора током электролитически генерированного водорода.

Использовали холинэстеразу марки КФ 3.1.1.8 сыворотки крови лошади, изготовленную Пермским НИИ вакцин и сывороток с активностью 110 АЕ/мг. В качестве субстрата применяли растворы бутирилтиохолин иодида (БТХИ), которые

готовили по точной навеске в боратном буферном растворе и использовали в течение не более трёх часов.

Использовали хроматографически чистый сим-1,3,5-триазиновый гербицид симазин (2-хлор-4,6-бис (этиламино)-сим-триазин). Поликлональные антитела против симазина были получены на кафедре химической энзимологии МГУ. Концентрацию водных растворов антител (Ат) определяли спектрофотометрически при $t^\circ = +25^\circ\text{C}$, $\lambda = 280$ нм по формуле $C_{\text{Ат}} (\text{мг/мл}) = A_{280} / 2,5$, где A_{280} – оптическая плотность исследуемого раствора; 2,5 – коэффициент градуировочной зависимости.

Иммобилизованные холинэстеразу и антитела получали в лабораторных условиях, используя нитрат целлюлозы (НЦ) типа коллоксилин, 25 %-ный глutarовый альдегид фирмы ICN и органические растворители высокой чистоты (толуол, бутилацетат, гексан). В качестве носителей для иммобилизации антител также использовали промышленно изготавливаемые ацетатцеллюлозные (АЦ) мембраны (ЗАО НТЦ "Владипор", Россия) с размером пор 0,2 и 1 мкм.

Измерения проводили в боратном ($\text{pH} = 9,05 \pm 0,05$) и аммиачном ($\text{pH} = 9-10$) буферных растворах, приготовленных из препаратов марки ХЧ и ЧДА. Раствор соли Co^{2+} с концентрацией $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л готовили из препаратов марки ХЧ.

Получение биочувствительной части холинэстеразного биосенсора

Для получения иммобилизованной холинэстеразы навеску нитроцеллюлозы растворяли в смеси органических растворителей – толуола и бутилацетата, затем добавляли водный раствор холинэстеразы. После перемешивания в течение 2–3 минут добавляли глutarовый альдегид, как бифункциональный реагент, перемешивали еще 2–3 минуты и затем приливали несколько капель гексана в качестве коагулянта. Из этой смеси на поверхности чашки Петри диаметром 90 мм получали пленку, которую высушивали при комнатной температуре. Затем пленку промывали дистиллированной водой. Площадь биочувствительной части сенсора составляла $7,95 \pm 0,05 \text{ см}^2$.

Подготовку рабочей поверхности стационарного ртутно-пленочного электрода проводили, как описано в работе [13].

Получение иммобилизованных антител

Для получения лабораторно изготавливаемых иммобилизованных антител применялись те же реактивы, что и в случае получения ИХЭ. Вместо водного раствора фермента в пленку добавляли водный раствор антител с определенной концентрацией.

Для получения антител, иммобилизованных на мембранах промышленного производства (АЦ мембраны), определенное количество раствора антител равномерно наносили на поверхность носителя размером 2 см^2 с последующей обработкой в парах 12,5%-ного глутарового альдегида.

Иммобилизованные антитела (ИАт) перед применением выдерживали 30 минут в растворе бычьего сывороточного альбумина для предотвращения неспецифического связывания и блокирования активных участков глутарового альдегида.

Хранили ИХЭ и ИАт при $t^\circ = +4^\circ\text{C}$ не более 30 суток и использовали однократно.

Результаты и их обсуждение

Для разработки иммунохимического определения симазина требовалось прежде всего оценить возможность и подобрать рабочие условия вольтамперометрического детектирования содержания симазина с помощью амперометрического холинэстеразного биосенсора (АХЭБ), а затем подобрать рабочие условия проведения стадии извлечения симазина из анализируемых образцов методом иммуноэкстракции.

Изучение влияния симазина на иммобилизованную холинэстеразу, входящую в состав амперометрического биосенсора, показало, что сима-

зин проявляет себя в определенной области концентраций как ингибитор ($2 \cdot 10^{-11}$ - $1 \cdot 10^{-6}$ М), а при более низких концентрациях ($1 \cdot 10^{-13}$ - $2 \cdot 10^{-11}$ М) - как активатор реакции холинэстеразного гидролиза БТХИ. В этих диапазонах наблюдалось, соответственно, уменьшение или увеличение величины аналитического сигнала, относящегося к обратимому восстановлению продукта ферментативного гидролиза БТХИ, при потенциале $-0,55\text{ В}$.

Согласно литературным данным, симазин не является специфическим эффектором ХЭ [14]. Однако, как показало наше исследование, он может оказывать влияние на каталитическую активность ХЭ. По-видимому, взаимодействие симазина с ХЭ может проходить по гидрофобным участкам, находящимся вблизи активного центра фермента, что может привести, в конечном итоге, к изменению количества субстрата, участвующего в ферментативном процессе. Изучение кинетических параметров ферментативной реакции (кажущихся констант Михаэлиса, максимальных скоростей) при варьировании концентраций симазина и субстрата позволило определить вид наблюдаемых эффектов и рассчитать константы ингибирования или активации (K_i), количественно характеризующие действие эффектора на активность фермента (табл. 1).

Таблица 1

Кинетические параметры реакции гидролиза БТХИ в присутствии ИХЭ и различных концентраций симазина

$C_{\text{БТХИ}}, \text{ моль/л}$	$C_{\text{симазина}}, \text{ моль/л}$	$K_{m(\text{каж})} \cdot 10^4, \text{ моль/л}$	$V_m \cdot 10^7, \text{ моль/л} \cdot \text{с}$	Тип эффекта	$K_i, \text{ моль/л}$
$2 \cdot 10^{-3}$	0	$2,8 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,1$	Псевдоингибирование	$(4,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-8}$
	10^{-7}	$3,9 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,2$		
	10^{-8}	$10,1 \pm 0,7$	$6,7 \pm 0,34$	Двухпараметрически рассогласованная активация	$(9,5 \pm 0,8) \cdot 10^{-14}$
	10^{-12}	$4,1 \pm 0,3$	$50,0 \pm 1,0$		
$8 \cdot 10^{-4}$	0	$2,9 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,1$	Псевдоингибирование	$(6,1 \pm 0,4) \cdot 10^{-10}$
	10^{-7}	$9,9 \pm 0,4$	$78,0 \pm 1,0$		
	10^{-8}	$12,4 \pm 0,6$	$85,0 \pm 2,0$		
	10^{-9}	$17,4 \pm 0,3$	$65,0 \pm 1,0$	Двухпараметрически рассогласованная активация	$(2,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-13}$
	10^{-12}	$7,9 \pm 0,4$	$5,9 \pm 0,2$		
$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-13}	$4,1 \pm 0,3$	$6,1 \pm 0,2$	Двухпараметрически согласованное ингибирование	$(4,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$
	0	$2,9 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,2$		
	10^{-7}	$5,7 \pm 0,3$	$2,7 \pm 0,1$	Двухпараметрически рассогласованное ингибирование	$(4,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-7}$
	10^{-8}	$1,4 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,1$		
	10^{-12}	$5,4 \pm 0,5$	$18,4 \pm 0,8$	Двухпараметрически рассогласованная активация	$(9,9 \pm 0,8) \cdot 10^{-14}$
	10^{-13}	$4,1 \pm 0,2$	$8,8 \pm 0,4$		

Полученные кинетические характеристики показывают, что типы наблюдаемых эффектов изменяются в зависимости от соотношения концентраций исследуемого гербицида и субстрата в растворе. При более высоких содержаниях симазина и БТХИ наблюдается эффект псевдоингибирования, при котором происходит уменьшение сродства фермента к субстрату и увеличение скорости ферментативной реакции. В случае меньшей концентрации субстрата ($5 \cdot 10^{-4}$ М) наблюдается двухпараметрически согласованное ингибирование, характеризующееся одновременным ослаблением связывания фермента с субстратом и снижением скорости реакции.

Установлено также, что при низких концентрациях симазина (10^{-13} – 10^{-12} М) наблюдаются эффекты активации, относящиеся к одному и тому же двухпараметрически рассогласованному типу активации.

Анализ кинетических данных, а также рассчитанные величины констант ингибирования указывают, на то, что хотя при концентрациях субстрата $2 \cdot 10^{-3}$ и $8 \cdot 10^{-4}$ М наблюдаются одинаковые типы эффектов, при концентрации субстра-

та $8 \cdot 10^{-4}$ М происходит более прочное связывание эффектора с ферментом (в этих случаях наблюдались более низкие значения K_m), что является более предпочтительным условием при определении эффектора с помощью АХЭБ.

Рабочее значение pH для определения симазина также было установлено на основании кинетических исследований ферментативной реакции гидролиза БТХИ в отсутствии или присутствии различных концентраций симазина и при различных pH (табл.2). Результаты исследований показали, что при pH 8.6-9.05 наблюдаются эффекты псевдо- и двухпараметрически рассогласованного ингибирования. При pH 10.1 эффект ингибирования менялся на незначительный по величине эффект ассоциативной активации, на что указывает значение константы активации. Значения K_a показывают, что при pH 9.05 величина эффекта ингибирования больше, чем при pH 8.6. Следует также отметить, что при значении pH 9.05 наблюдается максимальная величина каталитической активности ИХЭ. Поэтому при работе с АХЭБ для определения симазина предпочтительнее было использовать фоновый электролит с pH 9.05 ± 0.05 .

Таблица 2.

Влияние pH на кинетические параметры ферментативной реакции гидролиза БТХИ при $c_s = 8 \cdot 10^{-4}$ моль/л в присутствии симазина

pH	$c_{\text{симазина}}$, моль/л	$K_m \cdot 10^{-5}$, моль/л	$V_m \cdot 10^{-7}$, моль/л·с	Тип эффекта	K_a , моль/л
8,6	0	$6,4 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,1$	Двухпараметрически рассогласованное ингибирование Псевдоингибирование	$(4,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-8}$
	10^{-7}	$4,3 \pm 0,2$	$1,23 \pm 0,06$		
	10^{-8}	$94,0 \pm 1,0$	$3,8 \pm 0,3$		$(1,07 \pm 0,05) \cdot 10^{-9}$
	10^{-9}	$8,9 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,2$		
9,05	0	$2,9 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,1$	Псевдоингибирование	$(6,1 \pm 0,4) \cdot 10^{-10}$
	10^{-7}	$9,9 \pm 0,4$	$78,0 \pm 1,0$		
	10^{-8}	$12,4 \pm 0,6$	$85,0 \pm 2,0$		
	10^{-9}	$17,4 \pm 0,3$	$65,0 \pm 1,0$		
10,1	0	$8,3 \pm 0,4$	$1,25 \pm 0,07$	Ассоциативная активация	$(1,9 \pm 0,4) \cdot 10^{-8}$
	10^{-7}	$1,27 \pm 0,06$	$1,14 \pm 0,05$		
	10^{-8}	$3,5 \pm 0,2$	$1,36 \pm 0,06$		
	10^{-9}	$5,8 \pm 0,5$	$1,40 \pm 0,05$		

Разработка иммунохимического способа определения симазина включала выбор способа получения иммобилизованных антител с использованием различных носителей.

Один из способов основан на включении антител в объем носителя непосредственно в процессе его формирования. Другой способ получения иммобилизованных антител состоял в соче-

тании адсорбции и ковалентной пришивки антител на поверхность готовых АЦ мембранных фильтров в парах глутарового альдегида. Время обработки парами перекрестносвязывающего реагента варьировали с целью получения прочно удерживающихся и одновременно реакционноспособных иммобилизованных антител. Установлено, что при иммобилизации на ацетатцел-

люлозных мембранах с размером пор 1 мкм необходима дополнительная обработка мембран в растворе ТРИС-HCl буфера (pH=7,4), содержащем 1 M NaCl, для удаления слабо удерживаемых антител. При использовании таких же мембран с меньшим размером пор такая дополнительная обработка не требовалась.

Прочность связывания антител на поверхности и внутри мембраны контролировали по каталитическим волнам выделения водорода, которые наблюдаются в аммиачном буфере (pH 9-10), содержащем соединения белковой природы, в присутствии Co^{2+} при $E = -1,4 - 1,5$ В [15]. Если при добавлении аликвоты раствора после промывки иммобилизованных антител к аммиачному буферу, содержащему соли Co^{2+} , не наблюдалось появления волны, соответствующей каталитическому выделению водорода, то это указывало на достаточно прочное удерживание белка мембраной.

Полученные иммобилизованные антитела использовали для проведения иммуноэкстракции симазина из анализируемых растворов за счет образования иммунных комплексов антитело-гербицид на поверхности мембраны. Введение стадии иммуноэкстракции перед непосредственным определением содержания пестицида с помощью АХЭБ позволило обеспечить селективность определений симазина.

Для выбора оптимальных условий иммуноэкстракции варьировали исходную концентрацию антител для иммобилизации (0,05; 0,076 мг/мл), условия получения и разрушения иммунных комплексов, время проведения этих стадий. Было установлено, что образование иммунных комплексов протекает лучше всего при нейтральных значениях pH (около 7,0) и при температуре рабочего раствора +25°C. Такие условия близки к естественным условиям функционирования нативных антител и обеспечивают наилучшие условия для иммунореакции. Для разрушения иммунного комплекса использовали боратный буферный раствор (pH=9,05 ± 0,05).

Был установлен также временной режим проведения иммуноэкстракции, обеспечивающий полноту извлечения определяемого соединения. Стадии образования и разрушения иммунного комплекса проводили в течение 15 минут. Однако при использовании антител с исходной концентрацией 0,076 мг/мл это время могло быть уменьшено до 5 минут.

Для характеристики используемых антител были определены константы связывания иммобилизованных антител с симазином (табл.3).

Полученные значения являются количественными характеристиками прочности образующихся иммунных комплексов. Как видно из таблицы, наиболее подходящими для использования в иммунохимическом определении являются ИАт с концентрацией 0,05 мг/мл, так как в этом случае константы аффинности имеют большие значения.

Таблица 3

Константы связывания иммунного комплекса
Ат-гербицид (n=5, p=0,95)

Концентрация антител, мг/мл	Константа связывания K_a , моль ⁻¹	
	K_{a1}	K_{a2}
0,05	$(2,2 \pm 0,2) \cdot 10^{11}$	$(6,8 \pm 0,9) \cdot 10^8$
0,076	$(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^9$	$(5,0 \pm 0,5) \cdot 10^8$

Проведенные исследования позволили выбрать условия селективного и чувствительного определения симазина с помощью ИАт как экстрагентов и АХЭБ. Оптимальными условиями амперометрического детектирования являются концентрация БТХИ $8 \cdot 10^{-4}$ М, значение pH=9,05±0,05. Рабочий диапазон определения симазина в воде с помощью разработанной методики составляет $5 \cdot 10^{-11}$ - $1 \cdot 10^{-8}$ М при использовании для иммобилизации в нитратцеллюлозные мембраны раствора Ат с концентрацией 0,05 мг/мл. Нижняя граница определяемых содержаний составляет $1 \cdot 10^{-11}$ моль/л.

При использовании ацетатцеллюлозных фильтров для иммобилизации использовали раствор Ат с концентрацией 0,076 мг/мл. В этом случае определение симазина было возможно в области концентраций $1 \cdot 10^{-10}$ - $3 \cdot 10^{-9}$ с нижней границей определяемых содержаний $7 \cdot 10^{-11}$ М.

Результаты определений симазина в модельных образцах воды, проведенных с помощью разработанной методики, представлены в табл.4.

Таблица 4

Результаты определения симазина с помощью
иммобилизованных различными способами
антител и амперометрического холинэстеразного
биосенсора (n=5, p=0,95)

Введено, моль/л	Найдено, моль/л			
	НЦ мембраны	Sr	АЦ мембраны	Sr
$5,0 \cdot 10^{-9}$	$(4,8 \pm 0,1) \cdot 10^{-9}$	0,012	-	-
$1,0 \cdot 10^{-9}$	$(0,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-9}$	0,021	$(0,9 \pm 0,4) \cdot 10^{-9}$	0,086
$5,0 \cdot 10^{-10}$	$(4,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-10}$	0,032	$(3,6 \pm 0,7) \cdot 10^{-10}$	0,105

Полученные данные показывают, что в определенной области концентраций возможно использование обоих вариантов иммобилизации антител. В то же время можно отметить, что воз-

возможность использования промышленно выпускаемых ацетатцеллюлозных мембран с иммобилизованными антителами во многих случаях более удобно и предпочтительнее для практического использования.

Исследуемый гербицид является строго контролируемым объектом анализа, обладающим, кроме этого, устойчивостью к разложению в окружающей среде, поэтому представляло интерес оценить содержание его остаточных количеств в водах различного происхождения (поверхностные, грунтовые), а также в пищевых продуктах (молоко и молочные продукты).

Используя разработанный метод иммуноанализа и учитывая выбранные оптимальные условия, было проведено иммунохимическое определение симазина в образцах проб воды из различных источников.

Определение симазина в природных водах с использованием иммобилизованных антител и АХЭБ

Нитратцеллюлозную мембрану с иммобилизованными антителами помещали в 5 мл исследуемого раствора и инкубировали в течение 15 минут. Затем ее промывали дистиллированной водой и переносили в электрохимическую ячейку, в которую предварительно вводили 4,5 мл боратного буферного раствора ($\text{pH}=9.05 \pm 0.05$). После инкубирования в течение 15 минут, во время которого происходило разрушение иммунного комплекса, пленку с иммобилизованными антителами удаляли, а в ячейку вводили раствор БТХИ с концентрацией $8 \cdot 10^{-4}$ М. В течение 15 минут из раствора удаляли кислород при перемешивании, а затем определяли содержание пестицида в растворе с помощью АХЭБ. Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5

Иммунохимический анализ образцов проб воды с помощью иммобилизованных антител и АХЭБ ($n=5$, $p=0.95$)

№ п/п	Образец	Концентрация гербицида, моль/л	Sr
Симазин			
1	Вода озера "Чистое"	$(1,3 \pm 0,4) \cdot 10^{-10}$	0,15
2	Вода скважины № 20	$(1,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-11}$	0,27
3	Вода реки "Мурзинка"	$(2,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-10}$	0,14

Как показывают полученные результаты, в исследуемых объектах содержались остаточные количества гербицида. Данные показатели указывают на загрязнение исследуемых вод, так как присутствие следов симазина в воде не допуска-

ется. Все это говорит о необходимости проведения постоянного мониторинга следов пестицидов в объектах окружающей среды.

С помощью иммобилизованных антител против симазина и АХЭБ была разработана методика определения симазина в молоке и молочных продуктах.

Для построения градуировочного графика определения симазина в молоке использовали модельные растворы, приготовленные из сухого молока. Молоко восстанавливали путем растворения в теплой воде, не растворившиеся частички отфильтровывались. Затем в молоко вводилось определенное количество симазина. Перед стадией иммуноэкстракции образцы молока разбавлялись в 10 раз. Дальнейшие операции проводились так же, как и в случае с определением симазина в воде.

Градуировочный график, построенный для определения симазина в молочных продуктах, имеет линейный участок в области концентраций $5 \cdot 10^{-11}$ - $1 \cdot 10^{-8}$, что позволяет проводить в этом диапазоне определение симазина с помощью АХЭБ. Результаты определений симазина в модельных образцах молока представлены в табл. 6. Показано, что предлагаемый вариант иммунохимического определения позволяет также определять симазин в присутствии родственных соединений ($S_r < 0.058$).

Таблица 6

Результаты определения симазина в модельных образцах молока с использованием иммобилизованных антител и АХЭБ ($n=5$, $p=0.95$)

Пестицид	Введено, моль/л	Найдено, моль/л	S_r
Симазин	$5,0 \cdot 10^{-9}$	$(4,8 \pm 0,4) \cdot 10^{-9}$	0,08
	$2,5 \cdot 10^{-9}$	$(1,3 \pm 0,5) \cdot 10^{-9}$	0,20
	$5,0 \cdot 10^{-10}$	$(5,0 \pm 0,5) \cdot 10^{-10}$	0,10
Смесь пестицидов: симазин	$5 \cdot 10^{-10}$	$(2,0 \pm 0,5) \cdot 10^{-10}$	0,16
атразин	$5 \cdot 10^{-10}$		
пропазин	$5 \cdot 10^{-11}$		

Следует отметить, что предлагаемый способ определения пестицида требует минимального количества операций при пробоподготовке, либо вообще в ней не нуждается. В данном случае пробоподготовка образцов молока сводилась лишь к их разбавлению перед проведением иммуноэкстракции в 10 раз. Данная процедура проводилась для того, чтобы уменьшить возможные матричные влияния и добиться максимально возможного извлечения пестицида с помощью ИАТ.

Проведенный анализ нескольких образцов молочных продуктов, а именно молока пастеризованного, кефира нежирного (продукция ООО "Эдельвейс-М", г.Казань) и молока не пастеризованного (Лаишевский район, Татарстан), показал отсутствие симазина.

Таким образом, данные методики определения симазина в воде и молочных продуктах мо-

гут быть предложены для чувствительного и селективного обнаружения пестицида в таких важных объектах экологического контроля как, вода и пищевые продукты.

Авторы работы выражают благодарность старшему научному сотруднику кафедры энзимологии МГУ Еремину С.А. за предоставленные анти тела к симазину.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каспаров В.А. Применение пестицидов за рубежом / В.А. Каспаров, В.Н. Промоненков. М.: Агроиздат, 1990. 224 с.
2. Врочинский К.К. Экологотоксикологогигиенические регламенты пестицидов для объектов окружающей среды / К.К.Врочинский, Е.А.Мухопад // Материалы семинара "Химический анализ пищевых продуктов и загрязнений окружающей среды". М.: ЦРДЗ, 1992. С.24-31.
3. Байерман К. Определение следовых количеств органических веществ: Пер. с англ. М.: Мир, 1987. 429 с.
4. Vanderhoff C.R. Trace analysis of pesticides by gas chromatography / C.R.Vanderhoff, P.Vanzoonen// Journal of Chromatography. 1999. V.843, №1-2. P.301-322.
5. Yazynina E.V.Immunoassay techniques for detection of the herbicide simazine based on use of oppositely charged water-soluble polyelectrolytes / E.V.Yazynina, A.V.Zherdev, B.B.Dzantiev, V.A.Izumrudov, S.J.Gee, B.D.Hammonck // Analytical Chemistry. 1999. V.71, №16. P.3538-3543.
6. Gonzalezmartinez M.A.Reversible immunosensor for the automatic determination of atrazine. Selection and performance of three polyclonal antisera / M.A.Gonzalezmartinez, R.Puchades, A.Maquieira, I.Ferrer, M.P.Marco, D.Barcelo // Analytica Chimica Acta 1999. V.386. P.201-210.
7. Yazynina E.V. Microplate immunoassay technique using polyelectrolyte carriers: kinetic studies and application to detection of the herbicide atrazine / E.V.Yazynina, A.V.Zherdev, B.B.Dzantiev, V.A.Izumrudov, S.J.Gee, B.D.Hammonck // Analytica Chimica Acta. 1999. V.399. P.151-160.
8. Goodrow M.H. Hapten design for compound-selective antibodies: ELISAs for environmentally deleterious small molecules / M.H.Goodrow, B.D.Hammonck // Analytica Chimica Acta. 1998. V.376. P.83-91.
9. Nunes G.S. Evaluation of a highly sensitive amperometric biosensor with low cholinesterase charge immobilized on a chemically modified carbon paste electrode for trace determination of carbamates in fruit, vegetable and water samples / G.S.Nunes, D.Barcelo, B.S.Grabaric, J.M.Diazcruz, M.L.Ribeiro // Analytica Chimica Acta. 1999. V.399. P.37-49.
10. Everett M.R. Enzyme-based electrochemical biosensors for determination of organophosphorous and carbamate pesticides / M.R.Everett, G.A.Rechnitz // Analytical Letters. 1999. V.32, №1. P.1-10.
11. Nunes G.S. Acetylcholine enzyme sensor for determining methamidophos insecticide. Evaluation of some genetically modified acetylcholinesterases from *Drosophila melanogaster* / G.S.Nunes, T.Montesinos, P.B.O.Marques, D.Fournier, J.L.Marty // Analytica Chimica Acta. 2001. V.434. P.1-8.
12. Биосенсоры: основы и приложения: Пер. с англ. / Под ред. Э.Тернера, И.Карубе, Дж. Уилсона. М.: Мир, 1992. 616 с.
13. Медянцева Э.П. Определение вируса крапчатости гвоздики с помощью иммуоферментного электрода / Э.П.Медянцева, Ли Фа-Шень, О.В.Федосеева, Г.К. Будников и др. // Прикладная биохимия и микробиология. 1993. Т.29, №4. С.619-624.
14. Голиков С.Н. Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества / С.Н.Голиков, В.И.Розенгарт. Л.: Медицина. 1964. 382 с.
15. Кузнецов Б.А. Полярографический анализ микроколичеств белков / Б.А.Кузнецов, Г.П.Шумакович// Методы современной биохимии: Сб.науч.тр. М.: Наука, 1975. С.160-163.

* * * * *

IMMUNOEXTRACTIVE DETERMINATION OF HERBICIDE SIMAZINE RESIDUES IN WATER AND DAIRY PRODUCTS WITH AMPEROMETRIC DETECTION

N.Yu.Ilyicheva, E.P.Medyantseva, G.K.Budnikov

The technique of immunochemical determination of herbicide simazine using antibodies immobilized on different supports and amperometric cholinesterase biosensor is proposed. The working conditions of immuno-extraction and detection stages were investigated and optimized. The techniques for simazine determination in water and dairy products were developed (the limit of detection $1 \cdot 10^{-11}$ M).